

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Tena Brezović
6735/BT

OPTIMIRANJE PROIZVODNJE NAPITAKA NA
BAZI SIRUTKE I VOĆNOG KONCENTRATA

ZAVRŠNI RAD

Modul: Kemija i tehnologija mlijeka i mliječnih proizvoda
Mentor: doc.dr.sc. Katarina Lisak Jakopović

Zagreb, 2018.

Najljepše se zahvaljujem sljedećim osobama:

- Svojoj mentorici doc. dr. sc. Katarini Lisak Jakopović (Laboratorij za tehnologiju mlijeka i mliječnih proizvoda, Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu) na predloženoj temi, pruženoj stručnoj pomoći i savjetima pri izradi završnog rada , te uloženom trudu i strpljenju
- Snježani Šimunić, višoj tehničkoj suradnici Laboratorija za tehnologiju mlijeka i mliječnih proizvoda, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu na stručnoj pomoći i ugodnoj radnoj atmosferi
- Darjanu Pipiću, tehničaru Laboratorija za tehnološke operacije, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu na ugodnoj radnoj atmosferi i pruženoj stručnoj pomoći
- najveće hvala mojim roditeljima, bratu i Ivanu na pruženoj podršci i strpljenju koje su mi pružali tijekom cijelog studiranja

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za mlijeko i mliječne proizvode**

**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija**

OPTIMIRANJE PROIZVODNJE NAPITAKA NA BAZI SIRUTKE I VOĆNOG KONCENTRATA

Tena Brezović, 0058203438

Sažetak:

Kisela sirutka predstavlja veliki problem u mljekarskoj industriji. Postupak zbrinjavanja kisele sirutke je izrazito skup jer sadrži puno mineralnih tvari, a podložna je kvarenju zbog visokog sadržaja vode. Stoga je cilj rada bio optimirati proizvodnju napitaka na bazi sirutke i voćnog koncentrata uz dodatak aroma koristeći kiselu kravlju sirutku dobivenu tijekom proizvodnje svježeg sira. U preliminarnoj fazi istraživanja ispitivani su režimi pasterizacije 72 °C/35 sekundi, 78 °C/35 sekundi i 85 °C/40 sekundi u svrhu pronalaska optimalnog načina pasterizacije za daljnju obradu kisele sirutke. Na temelju kemijskih, mikrobioloških i senzorskih analiza utvrđeno je da su najbolji rezultati analize postignuti pasterizacijom 85 °C/40 sekundi, te je tako tretirana sirutka aromatizirana dodatkom voćnog koncentrata okusa kruška/marakuja uz dodatak arome tropskog voća. Proizvedenim napitcima na bazi sirutke i voćnog koncentrata određena je trajnost hladnim skladištenjem tijekom 21 dana, te su rezultati analiza pokazali da su napitci mikrobiološki i senzorski prihvatljivi do 14 dana hladnog skladištenja.

Ključne riječi: napitci, pasterizacija, proteini sirutke, sirutka

Rad sadrži: 33 stranica, 11 slika, 16 tablica, 53 literaturna navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u: Knjižnica
Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: doc.dr.sc. Katarina Lišak Jakopović

Pomoć pri izradi: Snježana Šimunić, teh.sur., doc.dr.sc. Irena Barukčić

Datum obrane: 10. rujna 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Undergraduate studies Biotechnology

Department of Food Engineering
Laboratory for Technology of Milk and Milk products

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

OPTIMIZING THE PRODUCTION OF BEVERAGES BASED ON THE WHEY AND FRUIT CONCENTRATE

Tena Brezović, 0058203438

Abstract:

Acid whey is the big problem in dairy industry. The process of disposing of acid whey is extremely expensive because it contains a lot of mineral substances and is vulnerable to high water content. Therefore, the purpose of this study was to optimize the production of beverages based on the whey and fruit concentrate with addition of aroma using acid cow whey obtained during the production of fresh cheese. In the preliminary stage of the study, the pasteurization regimes were tested for 72 °C / 35 seconds, 78 °C / 35 seconds and 85 °C / 40 seconds to find the optimum pasteurization method for further processing of acidic whey. Based on chemical, microbiological and sensory analyzes it was found that the best results were obtained by pasteurization at 85 °C / 40 seconds and so treated whey was flavored by the addition of fruit concentrate of the pear/passion fruit, with the added aroma of tropical fruit. Produced beverages based on the whey and fruit concentrate duration was determined within 21 days by cold storage, and the results of the analysis showed that the drinks were microbiologically and sensory acceptable until the 14th day of cold storage.

Keywords: beverages, pasteurization, whey, whey proteins

Thesis contains: 33 pages, 11 figures, 16 tables, 53 references, 0 supplements

Original in: Croatian

Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *PhD Katarina Lisak Jakopović, Assistant Professor*

Technical support and assistance: Snježana Šimunić, tech. assistant, PhD Irena Barukčić

Thesis delivered: September 10th 2018

Sadržaj:

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Sastav sirutke	2
2.2. Proteini sirutke	4
3. EKSPERIMENTALNI DIO	7
3.1. MATERIJALI	7
3.1.1. Sirovine	7
3.1.2. Proizvodnja napitaka okusa kruška marakuja/ananas, mango ili tropsko voće	8
3.2. METODE RADA	9
3.2.1. Proizvodnja i odabir sirutke za proizvodnju voćnih napitaka	9
3.2.2. Odabir režima pasterizacije sirutke	9
3.2.3. Analize prve serije eksperimenata	10
3.2.4. Analize druge serije eksperimenata	10
3.2.5. Određivanje pH vrijednosti aromatizirane sirutke	11
3.2.5.1. Određivanje titracijske kiselosti po Söxhlet-Henkeli sirove i nearomatizirane sirutke	11
3.2.6. Određivanje ukupne suhe tvari aromatizirane sirutke	12
3.2.7. Određivanje taloga aromatizirane sirutke stajanjem na hladnom	12
3.2.8. Određivanje boje aromatizirane sirutke	13
3.2.9. Određivanje distribucije veličine čestica aromatizirane sirutke	14
3.2.10. Mikrobiološka analiza aromatiziranih napitaka na bazi sirutke	15
3.2.10.1. Priprema fiziološke otopine i hranjivih podloga	15
3.2.10.2. Određivanje broja mikroorganizama u uzorcima	15
3.2.11. Senzorska analiza	16
3.2.11.1. Senzorska analiza napitaka na bazi sirutke i voćnog koncentrata	16
3.2.11.2. Ispitivanje prihvatljivosti napitaka na bazi sirutke i voćnog koncentrata	16
4. RASPRAVA	19
4.1. Preliminarne analize sirove i pasterizirane sirutke	20
4.2. Analiza proizvedenih napitaka na bazi sirutke i voćnog koncentrata tijekom pohrane	25

4.3. Ispitivanje prihvatljivosti proizvedenih napitaka na bazi sirutke i voćnog koncentrata.....	30
5. ZAKLJUČAK	31
6. LITERATURA	32

1. UVOD

1. UVOD

Sirutka je nusproizvod koji nastaje u (bio)tehnološkom procesu proizvodnje sira i kazeina, te je nedovoljno iskorišten sekundarni proizvod prehrambene industrije, kako u svijetu tako i u Hrvatskoj. Zbog svojeg nutritivno vrijednog sastava danas se sve više koristi kao supstrat u različitim biotehnološkim procesima, kao podloga za rast mnogih mikroorganizama, te kao sirovina za proizvodnju funkcionalnih i probiotičkih napitaka na bazi sirutke. 94 % proizvedene sirutke rezultat je proizvodnje različitih vrsta sireva, a oko 50 % sirutke se ne iskorištava u industrijama ili kao dodatak hrani u stočarstvu, nego se ispušta u prirodu kao otpadni materijal te predstavlja ekološki problem jer su njezina kemijska potrošnja kisika (KPK) i biološka potrošnja kisika tijekom pet dana (BPK₅) vrlo visoke (Bulatović i sur., 2012). U industriji mlijeka se tijekom proizvodnje 10-20 % mlijeka iskoristi za dobivanje proizvoda, dok preostalih 80-90 % čini sirutka, što znači da se od korištenih 10 litara mlijeka dobije kilogram sira uz nastajanje 9 litara sirutke. Prerada sirutke u svijetu temelji se na ne tako skupim i tehnološki ne zahtjevnim procesima, pa je tako jedan od najekonomičnijih načina prerade proizvedene sirutke proizvodnja napitaka (Bulatović i sur., 2012). Međutim, sirutka se najčešće prerađuje u sirutku u prahu jer je to najbolji način konzerviranja ili se proizvode koncentрати i izolati pojedinih sastojaka poput laktoze ili proteina. Do danas su razvijeni različiti proizvodi na bazi sirutke koji mogu biti proizvedeni od kisele, nativne slatke ili deprotonizirane sirutke, od svježje sirutke razrijeđene vodom ili fermentirane sirutke. Proizvedeni su i napitci u prahu s dodanim različitim aromama, te alkoholni napitci poput sirutkinog piva ili vina (Jeličić i sur., 2008).

Kisela sirutka predstavlja veliki problem u mljekarskoj industriji, te je postupak zbrinjavanja kisele sirutke izrazito skup jer sadrži puno mineralnih tvari, a podložna je kvarenju zbog visokog udjela vode. Stoga je cilj rada bio optimirati proizvodnju napitaka na bazi sirutke i voćnog koncentrata uz dodatak aroma koristeći kiselu kravlju sirutku. Osim toga, cilj rada je bio odrediti najbolji režim pasterizacije kisele sirutke pri kojem nastaje najmanje taloga te pratiti mikrobiološku, kemijsku i senzorsku sliku napitaka tijekom 21 dana hladnog skladištenja.

2. TEORIJSKI DIO

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Sastav sirutke

Sirutka je žuto-zelena tekućina koja se dobije odvajanjem koaguluma iz mlijeka, vrhnja te obranog mlijeka tijekom proizvodnje kazeina ili sira, pri čemu njen sastav i svojstva ovise o kvaliteti i sastavu korištenog mlijeka, te o tehnološkom procesu proizvodnje željenog proizvoda zbog čega je sirutka vrlo promjenjivog sastava (Režek, 2008). U svom sastavu, sirutka prosječno sadrži oko 93 % vode što je njen glavni nedostatak jer visok udio vode dovodi do tehnoloških problema prilikom prerade sirutke u razne proizvode zbog toga što tekuća sirutka predstavlja pogodan medij za rast i razmnožavanje mikroorganizama pa se mora toplinski obraditi pri nižim temperaturama pasterizacije jer sadrži termolabilne proteine sirutke koji se denaturiraju već pri 60 °C (Tratnik, 2003; Božanić i Tratnik, 2012). U sirutku prelazi oko 50 % suhe tvari mlijeka čiju glavninu (oko 70 %) čini laktoza, gotovo svi proteini sirutke koji su neosjetljivi na djelovanje kiseline ili enzima, topljive mineralne tvari i vitamini B skupine. Od ugljikohidrata, u sirutki oko 90 % čini laktoza zbog koje sirutka ima visoku energijsku vrijednost, dok proteina sirutke ima manje od 1 %. Kako sastav sirutke ovisi o načinu njezina dobivanja, odnosno o načinu koagulacije kazeina, koji je najzastupljeniji protein u mlijeku, razlikujemo slatku i kiselu sirutku koje se osim pH vrijednosti, najviše razlikuju u količini kalcija i fosfora, mliječne kiseline i laktata koje kisela sirutka sadrži znatno više jer je zbog veće kiselosti medija veća i topljivost mineralnih tvari (Božanić i Tratnik, 2012; Jeličić i sur., 2008). Međutim, za razliku od kisele sirutke, slatka sirutka je lakše kvarljiva zbog svoje pH vrijednosti, te uz proteine sirutke sadrži i glikomakropeptid (GMP) koji nastaje hidrolizom κ -kazeina (Božanić i Tratnik, 2012).

Proteini sirutke sadrže visok udio esencijalnih aminokiselina (poput lizina, cisteina i metionina) zbog čega su nutritivno najvrjedniji proteini koji u usporedbi s mliječnim proteinom kazeinom i animalnim proteinima, kao što su proteini jaja (tablica 1), imaju puno veću hranjivu vrijednost jer protein α -laktalbumin ima aminokiselinski sastav blizu biološkog optimuma. Također, za iskoristivost proteina u organizmu važan je omjer

aminokiselina cistein/metionin koji je kod proteina sirutke veći oko deset puta nego kod kazeina (Tratnik, 2003; Božanić i Tratnik, 2012). Uz esencijalne aminokiseline, značajne su i slobodne aminokiseline čiji je udio u sirutki promjenjiv i ovisi o stupnju hidrolize kazeina tijekom proizvodnje sireva (slatkih i kiselih), a njihov je udio u slatkoj sirutki veći oko četiri puta, dok je u kiseloj oko deset puta veći nego u mlijeku (Tratnik, 2003; Jeličić i sur., 2008).

Tablica 1. Prosječna biološka vrijednost proteina sirutke i drugih proteina (Režek, 2008).

Proteini	sirutke	jaja	mlijeka	govedine	kazeina	krumpira	brašna
BV	104	100	92	78	73	69	45

* BV – prosječna biološka vrijednost

U suhoj tvari sirutke, najviše je promjenjiv udio mineralnih tvari koji može varirati od 7 do 12 % zbog različitih biokemijskih procesa koji se odvijaju tijekom tehnoloških postupaka proizvodnje sireva, a smanjenje njihove vrijednosti događa se zbog smanjene topljivosti mineralnih tvari pri toplinskoj obradi. Međutim, povišen udio mineralnih tvari, baš kao i visok udio vode u sirutki, dovodi do tehnoloških problema i smanjenja ekonomičnosti proizvodnje. U sirutku iz mlijeka prelaze gotovo sve topljive soli i mikroelementi, vitamini B skupine, ali i soli koji su dodane tijekom proizvodnje sira (Božanić i Tratnik, 2012; Jeličić i sur., 2008). Udio vitamina topljivih u vodi varira i ovisi o načinu čuvanja sirutke, a najznačajniji su cijanokobalamin (vitamin B₁₂) i folna kiselina koji vezani na proteine sirutke velikim dijelom prelaze u sirutku pri proizvodnji sira, te riboflavin (vitamin B₂) koji sirutki daje karakterističnu žuto-zelenu boju, a njegov udio u sirutki može biti veći od udjela u mlijeku zbog aktivnosti bakterija mliječne kiseline tijekom proizvodnje sireva. Vitamin C (askorbinska kiselina) se razgradi već pri proizvodnji sira, zbog čega nije prisutan u sirutki (Tratnik, 2003; Božanić i Tratnik, 2012).

Tablica 2. Sastojci suhe tvari i udio proteina sirutke (Božanić i Tratnik, 2012).

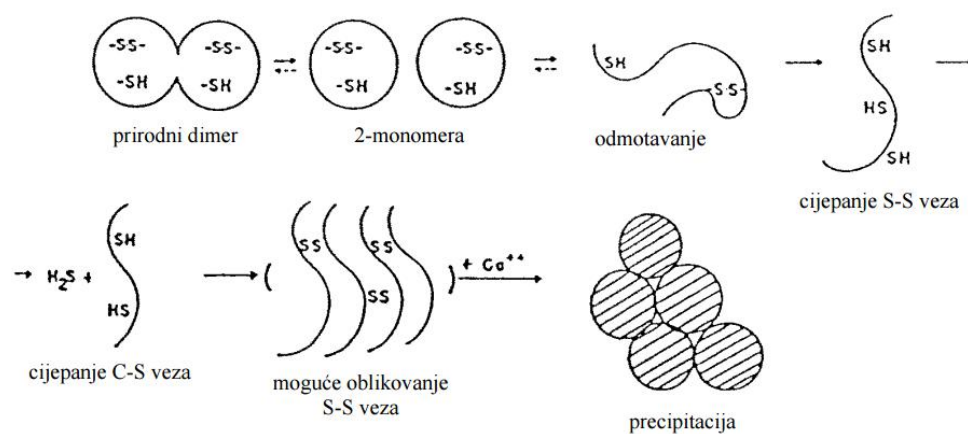
Sastojci suhe tvari	[g/100 ml]	(%) od ukupnih	Proteini sirutke	(%) od ukupnih
laktoza	4,66	71,7	β -laktoglobulin	50
proteini sirutke	0,91	14,0	α -laktalbumin	22
mineralne tvari	0,50	7,7	imunoglobulini	12
mliječna mast	0,37	5,7	proteoza-peptoni	10
ostalo	0,06	0,9	albumin krvnog seruma	5
UKUPNO	6,50	100	ostalo	1

2.2. Proteini sirutke

Sirutka sadrži 15 do 22 % od ukupne količine proteina u mlijeku (Duvnjak, 1983), pri čemu su kazein i proteini sirutke (prisutni u omjeru 80 %: 20 %) adsorbirani na površini membrane masnih globula te potječu iz plazme ili seruma mlijeka (Božanić i Tratnik, 2012). Proteini sirutke imaju izvrsna funkcionalna svojstva poput dobre topljivosti, viskoznosti, stabiliziranje emulzija, sposobnosti želiranja i stvaranja pjene zbog čega imaju široku upotrebu u prehrambenoj industriji (Jeličić i sur., 2008; Herceg i sur., 2006). Prema biološkoj vrijednosti (koja označava postotak od ukupne količine proteina koje organizam iskorištava), proteini sirutke se dijele na najvrijednije izolate proteina sirutke, zatim koncentrate proteina sirutke, intaktne proteine i slobodne aminokiseline, a veća biološka vrijednost proteina sirutke u odnosu na proteine mlijeka potječe od većeg udjela lizina (40%) i 2,5 puta većeg udjela cisteina i metionina (Režek, 2008; Božanić i Tratnik, 2012). Pojedine frakcije proteina sirutke sudjeluju u odvijanju važnih metaboličkih reakcija, imaju antimikrobno, antikancerogeno, antioksidativno i antiupalno djelovanje, te su prekursori za bioaktivne peptide, a njihova zastupljenost u proteinima sirutke je 50 % β -laktoglobulina, 22 % α -laktalbumina, 12 % albumin krvnog seruma, 10 % proteoze-peptoni, 5 % imunoglobulini (Režek, 2008; Božanić i Tratnik, 2012). Proteini sirutke su hidrofobniji u odnosu na kazein i samim time stabilniji na djelovanje enzima i kiseline, pa zaostaju u otopini nakon koagulacije kazeina i odvajanja sirnog gruš (sirutke). Istovremeno, proteini sirutke su termolabilni i koaguliraju pod utjecajem topline zbog

odsustva fosfora, te niskog sadržaja prolina, a visokog udjela metionina, cisteina i cistina u svom aminokiselinskom sastavu. Proteini sirutke se reverzibilno denaturiraju na temperaturi između 60 °C i 70 °C, a ireverzibilno na temperaturi većoj od 70 °C (Režek, 2008).

β -laktoglobulin (β -LG) je nekovalentno vezani dimer koji je stabiliziran vodikovim i drugim vezama, a predstavlja globularni protein u kojem je osam antiparalelnih β -nabranih ploča formirano oko središnje šupljine, pri čemu njegovu konformaciju čini sekundarna struktura (dio α -uzvojnice i dominantna β -nabrana ploča) i dio slučajnog klupka kao neodređene strukture (Herceg, 2004; Režek, 2008). Dimer se sastoji od dva peptidna lanca, a svaki monomer od 162 aminokiseline, te sadrži dvije disulfidne i tri tiolne skupine. Kod izoelektrične točke (pH= 3,5 - 5,2) dimeri β -laktoglobulina se povezuju u oktamere, dok pri pH vrijednosti nižoj od 3,5 disociraju do monomera. Pri 60 °C dimer disocira u otopini i postaje prikladan za denaturaciju, a pri temperaturi višoj od 70 °C pojačava se aktivnost SH-skupina i dolazi do stvaranja disulfidnih (S-S) mostova u β -laktoglobulinu (Božanić i Tratnik 2012; Režek, 2008).



Slika 1. Prikaz utjecaja topline na β -laktoglobulin (Božanić i Tratnik, 2012).

α -laktalbumin (α -LG) je monomerni protein koji se sastoji od 123 aminokiselina, sadrži osam cisteinskih skupina koje su uključene u četiri disulfidne veze, te ne sadrži slobodne SH-skupine. Kompaktan je protein koji ima više α -uzvojnica nego β -nabranih ploča jer sadrži vrlo malo aminokiseline prolin zbog čega je gotovo okruglog oblika (Božanić i Tratnik, 2012; Režek, 2008). Najotporniji je protein sirutke na djelovanje topline, što ovisi i o trajanju grijanja i visini temperature, te zbog toga što vrlo često veže jedan ion Ca^{2+} koji pri $\text{pH} < 5$ disocira iz monomera i tada on postaje skloniji denaturaciji djelovanjem topline (Božanić i Tratnik, 2012). α -laktalbumin se javlja u dvije genetske varijante (A i B), pri čemu je protein A UDP-galaktozil-transferaza, a protein B je α -laktalbumin koji povećava aktivnost tog enzima (Božanić i Tratnik 2012; Režek, 2008).

Albumin krvnog seruma (BSA) je monomerni protein koji sadrži 582 aminokiseline, te je ovalnog oblika jer 60 % strukture čini α -uzvojnica. Po svojim svojstvima i sastavu je identičan serum-albuminu, te se od njega ne razlikuje niti imunološki (Božanić i Tratnik, 2012).

Proteoze-peptoni (PP) su termostabilne i heterogene frakcije koje se ubrajaju u fosfoglikoproteine, te se obično nalaze vezane za micale β -kazeina, dok se većina nalazi u serumu mlijeka. Proteoza-peptoni su stabilni na djelovanje enzima, kiseline ili topline, te kataliziraju neke biološke reakcije i utječu na vezanje vitamina i mineralnih tvari (Božanić i Tratnik, 2012; Herceg i sur., 2006; Režek, 2008).

Imunoglobulini (Ig) su najmanje zastupljeni proteini u sirutki koji su ujedno i najosjetljiviji na toplinsko djelovanje, te sadrže i ugljikohidratnu skupinu zbog čega se uvrštavaju u glikoproteine. Imunoglobulini se sastoje od više genetskih varijanti, a to su IgM, IgA i IgG (IgG_1 i IgG_2) koje u ovom navedenom redoslijedu sadrže sve manje ugljikohidrata. Oni predstavljaju specifična antitijela koja imaju veliku molarnu masu, te je njihova osnovna fiziološka funkcija vezivanje antigena (Božanić i Tratnik 2012; Režek, 2008).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Sirovine

Za izradu napitaka na bazi sirutke i voćnog koncentrata korištena je sirutka dobivena tijekom proizvodnje sira iz kravljeg mlijeka pomoću mezofilne bakterijske kulture Probat 222 (Danisco Choozit Cheese Cultures, Kopenhagen, Danska).



Slika 2. Sirova sirutka (vlastita fotografija).

Tablica 3. Mikrobiološki sastav kulture Probat 222.

Bakterijska kultura	Udio [%]
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	90,0 - 99,8
<i>Lactococcus lactis subsp. cremosis</i>	90,0 - 99,8
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis biovar. diacetylactis</i>	0,1 - 5,0
<i>Leuconostoc mesenteroides subsp. cremosis</i>	0,1 - 5,0

Kao voćni koncentrat korišten je sirup od kruške i marakuje koji sadrži 95 % koncentriranog soka od kruške i 5 % koncentriranog soka od marakuje (ekološki uzgoj, Biovega d.o.o, Zagreb, Hrvatska).

Aromatiziranje sirutke u preliminarnom dijelu eksperimenta (poglavlje 3.1.2. i 3.2.3.) provedeno je pomoću arome ananasa, manga i tropskog voća (Döhler, Darmstadt, Njemačka).

Za zaslađivanje je upotrijebljena stevia (PE 90 % steviosides, Naturex, New Jersey, SAD) ili konzumni bijeli šećer (Viro, Virovitica, Hrvatska).

3.1.2. Proizvodnja napitaka okusa kruška marakuja/ananas, mango ili tropsko voće

Tablica 4. Sastav napitaka na bazi sirutke i voćnog koncentrata.

Napitak	Omjer sirupa i sirutke	Aroma	Zaslađivač
A	1:5	0,25 ml manga	3,2 g šećera / 100 ml
A1	1:5	0,25 ml manga	5,0 g šećera / 100 ml
A2	1:5	0,25 ml manga	2 %-tna otopina stevie (1,35 ml)
B	1:5	0,25 ml ananasa	3,2 g šećera / 100 ml
B1	1:5	0,25 ml ananasa	5,0 g šećera / 100 ml
B2	1:5	0,25 ml ananasa	2 %-tna otopina stevie (1,35 ml)
C	1:5	0,25 ml tropskog voća	3,2 g šećera / 100 ml
C1	1:5	0,25 ml tropskog voća	5,0 g šećera / 100 ml
C2	1:5	0,25 ml tropskog voća	2 %-tna otopina stevie (1,35 ml)

3.2. METODE RADA

3.2.1. Proizvodnja i odabir sirutke za proizvodnju voćnih napitaka

Sirovo kravlje mlijeko zagrijano je do temperature od 45 °C i zatim je preneseno u centrifugalni separator (Technica, 2002) kako bi se provelo obiranje mlijeka, odnosno kako bi se postigao željeni udio mliječne masti od 0,5 do 1 % u mlijeku prije pasterizacije i daljnje obrade. Nakon obiranja, mlijeko je pasterizirano na 85 °C kroz 10 minuta i zatim ohlađeno na 30 °C. Ohlađeno i obrano mlijeko podijeljeno je na tri jednaka volumena koja su zatim inokulirana s tri različite mezofilne kulture (Choozit BT 01, Choozit MA 11 i Choozit Probat 222), te je provedena fermentacija u svrhu dobivanja svježeg kravljeg sira.

Tijekom proizvodnje sira i njegovog cijedenja dobivene su tri kisele sirutke koje su se razlikovale prema svojim senzorskim svojstvima, te je na temelju rezultata senzorske analize, kao najprihvatljivija sirutka za proizvodnju voćnih napitaka, odabrana sirutka dobivena pomoću kulture Probat 222 koja je bistra, karakteristične zeleno-žute boje, te nema vidljivo izdvojenu mliječnu mast i kazeinsku prašinu.

3.2.2. Odabir režima pasterizacije sirutke

U svrhu pronalaska režima pasterizacije optimalnog za daljnju obradu kisele sirutke, sirutka je podijeljena na tri jednaka volumena i provedena je pasterizacija na 72 °C/35 sekundi, 78 °C/35 sekundi i 85 °C/40 sekundi. Nakon provedene pasterizacije dobivenim sirutkama određeni su pH vrijednost pomoću pH-metra i kiselost po Söxhlet-Henkelu, mikrobiološki parametri (ukupan broj mikroorganizama, broj kvasaca i plijesni, te broj enterobakterija), te količina taloga nastala tijekom 24-satnog hladnog skladištenja pomoću centrifugiranja.

3.2.3. Analize prve serije eksperimenata

Pasterizirana sirutka podijeljena je na devet jednakih volumena od 100 ml i prema prikazanim podacima u tablici 2 proizvedeni su napitci na bazi sirutke i voćnog koncentrata okusa kruška/marakuja uz dodatak nekoliko kapi arome ananasa, manga odnosno tropskog voća prema uputi proizvođača. Za zaslađivanje sirutke dodan je konzumni bijeli šećer (3,2 g ili 5,0 g / 100 ml sirutke) ili 2 %-tna otopina stevie (2 g / 100 ml vodovodne vode) pri čemu je kod pripreme otopine stevie uzeto u obzir da 6 grama stevie zamjenjuje 1000 grama saharoze (Novoselec, 2011). Svih devet napitaka analizirano je mjerenjem pH vrijednost, te je određena masa taloga koja nastaje stajanjem na hladnom (+4°C u hladnjaku) nakon 24 sata pomoću centrifugiranja uzoraka. Također je provedena i senzorska analiza od strane osam senzorskih analitičara.

3.2.4. Analize druge serije eksperimenata

U sljedećoj seriji eksperimenta cilj je bio odrediti koju masu šećera odnosno volumen stevie je potrebno dodati tijekom proizvodnje voćnih napitaka C i C2 koji su odabrani za daljnju provedbu eksperimenata, te u kojem omjeru treba dodati voćni sirup u odnosu na volumen sirutke. Napitci na bazi sirutke proizvedeni su prema podacima prikazanim u tablici 5, te je na temelju senzorske analize koju je provelo pet analitičara odlučeno kako napitci 1 i 3 (u daljnjem radu se navode kao sirutka 1 i sirutka 2) imaju najbolja svojstva zbog čega su oni pripremljeni u većem volumenu. Odabranim uzorcima sirutke je određivana trajnost tijekom 21 dana hladnog skladištenja (+4 °C).

Tijekom hladnog skladištenja provedene su analize 1., 5., 9., 14. i 21. dan koje su obuhvaćale mjerenje pH vrijednosti, količine taloga, boje, distribucije veličine čestica, te suhe tvari (1., 14. i 21. dan hladnog skladištenja uzoraka). Također je provedena mikrobiološka analiza uzoraka, kao i senzorska analiza, te ispitivanje prihvatljivosti proizvoda kod potencijalnih potrošača.

Tablica 5. Druga serija eksperimenata - sastav napitaka na bazi sirutke i voćnog koncentrata.

Napitak	Omjer sirupa i sirutke	Aroma	Zaslađivač
1	1:5	0,25 ml tropskog voća	bez šećera
2	1:10	0,25 ml tropskog voća	2 g šećera / 100 ml
3	1:10	0,25 ml tropskog voća	0,9 ml stevia / 100 ml
4	1:10	0,25 ml tropskog voća	bez šećera

3.2.5. Određivanje pH vrijednosti aromatizirane sirutke

Prije početka provođenja mjerenja, elektroda se ispere destiliranom vodom i posuši staničevinom, te se prema uputi proizvođača kalibrira s najmanje dvije puferne otopine odgovarajućih pH vrijednosti. pH elektroda (3110 WTW, Weilheim, Njemačka) se uranja u uzorak sirutke, lagano miješa i očitava se vrijednost kada se pH vrijednost na zaslonu pH-metra ustali. Između dva mjerenja elektroda se ispere destiliranom vodom i suši staničevinom. Nakon provedene analize, elektrodu je potrebno dobro isprati destiliranom vodom i posušiti staničevinom, te se čuva u otopini kalijevog klorida (KCl-a) do sljedećeg mjerenja (Božanić i sur., 2012).

3.2.5.1. Određivanje titracijske kiselosti po Söxhlet-Henklu sirove i nearomatizirane sirutke

Prvo se priprema standardna boja koja predstavlja nijansu do koje je uzorak sirutke potrebno titrirati natrijevim hidroksidom (NaOH), a ona se priprema tako što se u Erlemeyerovu tikvicu otpipetira 20 ml uzorka sirutke i doda se 1 ml 5 %-tne otopine kobaltovog sulfata ($\text{CuSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$). Zatim se u drugu tikvicu otpipetira 20 ml uzorka sirutke te se doda 1 ml 2 %-tne otopine fenolftaleina, nakon čega se smjesa lagano promiješa i titrira 0,1 M NaOH do promjene boje u blijedo ružičastu boju koja odgovara boji prethodno pripremljene standardne boje. Kiselost sirutke računa se prema izrazu:

$$^{\circ}\text{SH} = a \times 2 \times f \quad [1]$$

pri čemu je a = volumen NaOH (ml) utrošen za neutralizaciju 20 ml sirutke, a faktor otopine natrijevog hidroksida iznosi $f=1$, $(\text{NaOH})= 0,1 \text{ mol/l}$ (Božanić i sur., 2012).

3.2.6. Određivanje ukupne suhe tvari aromatizirane sirutke

U aluminijske posudice dodalo se 15 g kvarcnog pijeska, te su se zajedno s poklopcima stavile na sušenje u sušionik (ST 01/02, Instrumentaria, Zagreb, Hrvatska) na temperaturu $105\text{ }^{\circ}\text{C}/30$ minuta, nakon čega su se posudice poklopile i premjestile u eksikator na hlađenje na dva sata do sobne temperature. Zatim su se posudice izvagale na analitičkoj vagi. U ohlađene aluminijske posudice s kvarcnim pijeskom odpipetiralo se 10 ml uzorka sirutke, izvagala se njihova masa s uzorkom, te su se ponovo stavile na sušenje u sušionik na $105\text{ }^{\circ}\text{C}$. Postupak sušenja uzorka provodio se sve dok razlika u masi dva uzastopna mjerenja nije prelazila 0,5 mg, odnosno dok se nije postigla konstantna masa uzorka sirutke (Božanić i sur., 2012). Udio ukupne suhe tvari sirutke izračunava se prema formuli:

$$\frac{\text{zadnja odvaga} - \text{prazna posudica}}{\text{odvaga uzorka}} \times 100 = \% \text{ suhe tvari} \quad [2]$$

3.2.7. Određivanje taloga aromatizirane sirutke stajanjem na hladnom

Mjerenje nastalog taloga provodi se tako što se prazne Falcon kivete od 45 ml izvažu na laboratorijskoj vagi i zabilježi se njihova masa, nakon čega se u njih otpipetira 25 ml uzorka sirutke. Kivete s uzorcima se centrifugiraju (Rotofix 32A, Hettich, Tuttlingen, Njemačka) na 3500 okretaja kroz 10 minuta pri čemu dolazi do taloženja proteina sirutke na dnu Falcon kiveta. Iz kiveta se pažljivo dekantira supernatant, a kivete s talogom se izvažu, te se na temelju različitih masa taloga tijekom pohrane uzoraka izračuna postotak smanjenja taloga prema jednadžbi (Marinčić, 2007):

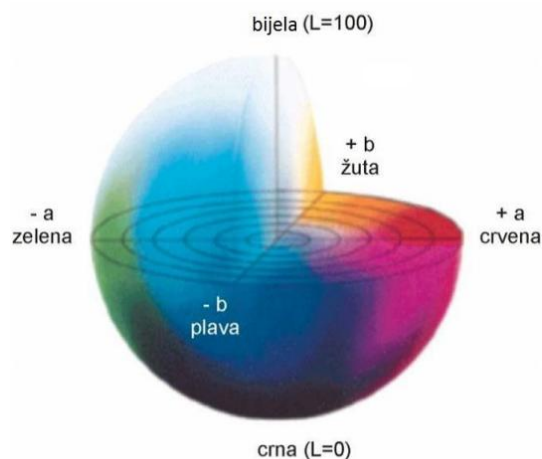
$$\% \text{ smanjenja taloga} = 1 - \left(\frac{\text{masa taloga uzorka}}{\text{masa taloga kontrole}} \right) \times 100 \quad [3]$$

3.2.8. Određivanje boje aromatizirane sirutke

Određivanje boje sirutke provedeno je na spektrofotometru (CM-3500d, Konica Minolta, Tokio, Japan) te je tijekom eksperimenta analizirano pet parametra boje L , a , b , C^* i h koji se kao Hunterove vrijednosti podudaraju sa sljedećim rasponima boja:

- a^* vrijednost: zeleno ($-a^*$) ili crveno ($+a^*$),
- b^* vrijednost: plavo ($-b^*$) ili žuto ($+b^*$),
- L^* vrijednost: svijetlo ($L^*=100$) ili tamno ($L^*=0$),
- C^* vrijednost predstavlja zasićenje boje,
- h vrijednost predstavlja ton (kut) boje.

Dio spektra u kojem se određuje boja sirutke je valno područje od 360 do 740 nm, te se prije mjerenja provodi kalibracija pomoću kivete u koju se dodaje destilirana voda.



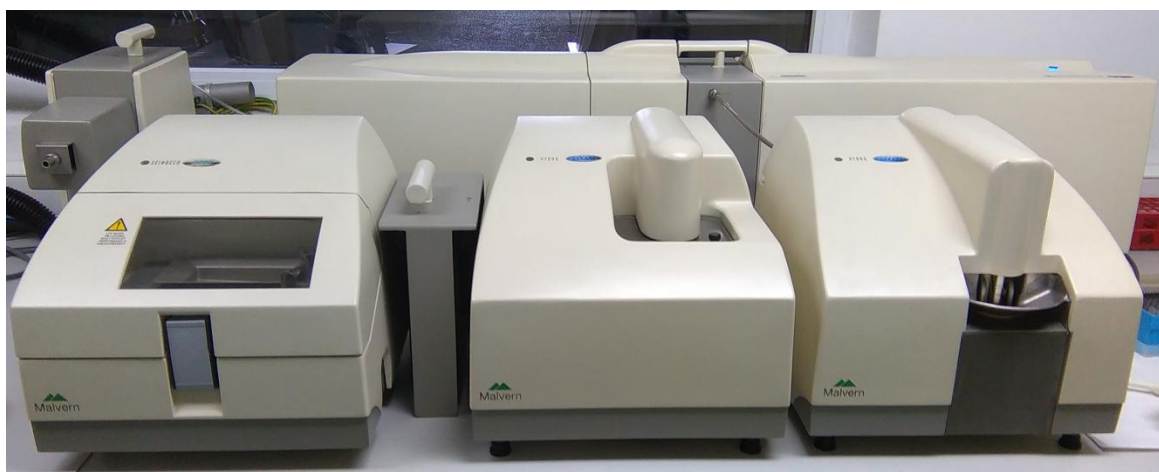
Slika 3. CIE $L^*a^*b^*$ obojeni prostor.

Razvijeni su različiti sustavi boja, a najraširenija je primjena CIE $L^*a^*b^*$ i XYZ sustava boja, pri čemu se u XYZ sustavu boja koriste X, Y i Z oznake za komponente boje gdje su X i Y oznake koje označavaju koordinate boje, a Z je oznaka za svjetlinu. CIE $L^*a^*b^*$ sustav boja temelji se na suprotnoj teoriji boja, kod kojeg L^* predstavlja funkciju svjetline i daje skalu od 0 do 100 jedinica svjetline, dok se kromatičnost boje definira u odnosu na neutralnu os

čija je vrijednost 0 kromatičnosti. Svaka boja definira se svjetlinom i kromatičnošću s tri točke na svakoj osi (Tretnjak, 2017).

3.2.9. Određivanje distribucije veličine čestica aromatizirane sirutke

Distribucija veličine čestica provedena je na uređaju Mastersizer 2000 (Malvern Panalytical, Almelo, Nizozemska) čiji se rad temelji na odstupanju laserske zrake prilikom prolaska kroz vodenu suspenziju čestica ispitivanog uzorka sirutke, a dobiveni se podatci obrađuju pomoću Mastersizer 2000 software-a.



Slika 4. Mastersizer 2000 (vlastita fotografija).

Određivanje veličine čestica laserskom difrakcijom temelji se na činjenici da čestice prilikom prolaska kroz izvor svjetlosti, odnosno kroz lasersku zraku, raspršuju svjetlost pod određenim kutom čija veličina ovisi o veličini samih čestica. Intenzitet raspršene svjetlosti ovisi o veličini čestica, a kut pod kojim čestice raspršuju svjetlost se logaritamski povećava sa smanjenjem veličine čestica. Iz toga slijedi da čestice velikih dimenzija raspršuju svjetlost pod malim kutovima, ali visokim intenzitetom, dok čestice malih dimenzija raspršuju svjetlost pod širim kutovima, te s manjim intenzitetom (Tretnjak, 2017).

3.2.10. Mikrobiološka analiza aromatiziranih napitaka na bazi sirutke

3.2.10.1. Priprema fiziološke otopine i hranjivih podloga

Pripremljena je 9 %-tna otopina natrijevog klorida (fiziološka otopina) otapanjem izvagane mase NaCl-a u destiliranoj vodi, nakon čega je pomoću dispENZERA raspodijeljeno po 9 ml u epruvete, koje su začepjene i sterilizirane u autoklavu, te su tijekom mikrobioloških analiza korištene za pripremu decimalnih razrjeđenja uzoraka sirutke.

Priprema hranjivih podloga provedena je u laboratorijskoj čaši od 2000 ml u koju je dodana odvagana masa dehidrirane hranjive podloge prema uputi proizvođača, te je otopljena u destiliranoj vodi na magnetnom mješaču uz zagrijavanje. Otopljene hranjive podloge, za određivanje ukupnog broja mikroorganizama te broja kvasaca i plijesni, prenesene su u prethodno sterilizirane infuzijske boce i sterilizirane u autoklavu. Otopljena hranjiva podloga za određivanje broja enterobakterija razlijevana je u sterilne Petrijeve zdjelice u sterilnim uvjetima, koje su nakon hlađenja čuvane u hladnjaku na +4 °C do uporabe.

3.2.10.2. Određivanje broja mikroorganizama u uzorcima

Uzorak aromatizirane sirutke se homogenizira i u sterilnim uvjetima pipetmanom sa sterilnim tipsom se uzima 1 ml uzorka i prenosi u epruvetu s 9 ml fiziološke otopine, te se homogenizira na vortex mješalici (MS2, IKA, Wilmington, SAD). Na taj način dobiva se prvo decimalno razrjeđenje uzorka, te se postupak razrjeđivanja provodi do željenog decimalnog razrjeđenja koja se kasnije nacjepljuju na sterilne hranjive podloge. Na gotove hranjive podloge za određivanje broja enterobakterija, nacjepljuje se 100 µl (0,1 ml), te se prethodno steriliziranim štapićem po Drygalskom, uzorak ravnomjerno razmazuje po površini podloge. Kod hranjivih podloga koje se razlijevaju bitno je pratiti temperaturu podloge zbog čega se takve hranjive podloge nakon otapanja u mikrovalnoj stavlja u vodenu kupelj, pri čemu temperatura otopljene podloge ne smije biti niža od 45 °C da ne bi došlo do skrutnjavanja, odnosno ne smije biti viša od 48 °C kako ne bi inhibirala ili u potpunosti inaktivirala mikroorganizme u uzorku. Kod otopljenih hranjivih podloga, u

sterilnu Petrijevu zdjelicu, naciepljuje se 1000 μm (1 ml) homogeniziranog uzorka i dodaje se otopljena podloga, te se na sve Petrijeve zdjelice zapisuju podaci o mikroorganizmu čiji porast na hranjivoj podlozi pratimo. Nakon naciepljivanja, hranjive podloge se inkubiraju u termostatima na optimalnim temperaturama za njihov rast. Kod određivanja ukupnog broja bakterija te broja kvasaca i plijesni inkubacija se provodi 72 sata na 30 °C, dok kod određivanja enterobakterija na 37 °C kroz 24 sata. Po završetku inkubacije provodi se brojanje poraslih stanica u Petrijevim zdjelicama, te se po potrebi broj poraslih mikroorganizama množi s faktorom razrjeđenja kako bi se dobio broj stanica prisutnih u 1 ml uzorka (Grgurovac, 2014).

3.2.11. Senzorska analiza

3.2.11.1. Senzorska analiza napitaka na bazi sirutke i voćnog koncentrata

Kod provođenja senzorske analize kvalitete napitaka na bazi sirutke i voćnog koncentrata praćeni su okus, miris, boja, talog i izgled tijekom hladnog skladištenja uzoraka 1., 5., 9., 14. i 21. dan, a ocjenjivanje je provodilo pet senzorskih analitičara koji su pojedino svojstvo napitaka ocijenili ocjenama od 1 do 5. U tablici 8 prikazani su opisni parametri svojstava napitaka na bazi sirutke, dok tablica 6 prikazuje obrazac za senzorsko ocjenjivanje proizvedenih napitaka.

3.2.11.2. Ispitivanje prihvatljivosti napitaka na bazi sirutke i voćnog koncentrata

Prihvatljivost proizvedenih napitaka 1 i 3 (tablica 5) provedena je na uzorku od 28 ispitanika koji su prema hedonističkoj skali ocjenama od 1 do 9 ocijenili napitke na bazi sirutke i voćnog koncentrata, a u tablici 7 prikazan je obrazac za ispitivanje prihvatljivosti dvaju napitaka na bazi sirutke i voćnog koncentrata.

Tablica 6. Obrazac za senzorsko ispitivanje napitka na bazi sirutke i voćnog koncentrata.

DATUM:		
OCJENJIVAČ:		
OCJENJIVANO SVOJSTVO:	<i>Molimo upisati postignutu ocjenu od 1 do 5 za svako svojstvo u koloni odgovarajućeg uzorka</i>	
	Sirutka 1	Sirutka 2
OKUS		
MIRIS		
BOJA		
TALOG		
IZGLED		

Tablica 7. Obrazac za ispitivanje prihvatljivosti napitaka na bazi sirutke i voćnog koncentrata.

HEDONISTIČKA SENZORSKA ANALIZA PRIHVATLJIVOSTI FERMENTIRANOG PROIZVODA		
<p>Na ljestvici od 1 do 9 ocijenite sviđanje pojedinog uzorka, pri čemu je značenje ocjena:</p> <p>1 - izrazito mi se ne sviđa</p> <p>2 - veoma mi se ne sviđa</p> <p>3 - umjereno mi se ne sviđa</p> <p>4 - neznatno mi se ne sviđa</p> <p>5 - niti mi se sviđa, niti mi se ne sviđa</p> <p>6 - neznatno mi se sviđa</p> <p>7 - umjereno mi se sviđa</p> <p>8 - veoma mi se sviđa</p> <p>9 - izrazito mi se sviđa</p>		
Uzorak	Sirutka 1	Sirutka 2
Ocjena sviđanja		

Tablica 8. Opisni parametri senzorskih svojstava napitaka na bazi sirutke (modificirano prema IDF, 1984).

SENZORSKO SVOJSTVO	OPISNI PARAMETRI	OCJENA
Okus	Jasno izražen, karakterističan za sirutku, bez stranih okusa, dobro ili vrlo dobro izražena aroma i okus, dobro ili vrlo dobro izražena svježina, slatkoća	4 - 5
	Preizražen okus na sirutku, tragovi kiselosti, gorčine i užglosti, tragovi stranih okusa	3
	Proizvod stranog i nekarakterističnog okusa, užegao, kiseo i gorak, okus po plijesni	1 - 2
Miris	Ugodan, ni presnažan ni preslab, karakterističan za napitke na bazi sirutke, bez ikakvih stranih mirisa	4 - 5
	Prenaglašen miris ili nedovoljno izražen, slabije se osjeti miris sirutke, tragovi užglosti	3
	Potpuno nekarakterističan za sirutku, stran, užegao, po plijesni	1 - 2
Boja	Boja karakteristična za sirutku (prema dodanom koncentratu), jednolična, bez vidljivih nepravilnosti	4 - 5
	Dobra, ali prisutna prošaranost	3
	Neprihvatljiva ili netipična	1 - 2
Bistroća (talog)	Bez taloga	5
	Prisustvo taloga u manjim količinama	3 - 4
	Puno taloga, neprihvatljivo	1 - 2
Izgled	Odličan, tipičan za sirutku s dodanim koncentratima, bez nepoželjnih karakteristika	4 - 5
	Manje izražene nepoželjne karakteristike	3
	Neprihvatljiv, strane boje, prisutna strana tijela	1 - 2

4. REZULTATI i RASPRAVA

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom je radu kao sirovina korištena kisela sirutka dobivena tijekom tehnološkog procesa proizvodnje svježeg sira iz svježeg kravljeg mlijeka (OPG Šmida, Vrbovec, Hrvatska) u svrhu pronalaska režima pasterizacije optimalnog za daljnju obradu kisele sirutke. Nakon odabira najpovoljnijeg načina pasterizacije, sirutka je aromatizirana dodatkom voćnog koncentrata i arome tropskog voća, te je pohranjena na 21 dan kako bi se odredila trajnost proizvedenih napitaka koji su 1., 5., 9., 14. i 21. dan analizirani u dvije paralele radi statističke pouzdanosti.

4.1. Preliminarne analize sirove i pasterizirane sirutke

U ovom eksperimentu dobivena je kisela sirutka za koju je karakterističan pH manji od pet što je vidljivo i iz izmjerenih pH vrijednosti sirove i pasteriziranih sirutki (4,48 - 4,59). Također je određena i titracijska kiselost uzoraka sirutke pri čemu se može uočiti da što je pH sirutke niži, to će °SH vrijednost biti viša (tablica 9). U svrhu pronalaska režima pasterizacije optimalnog za daljnju obradu kisele sirutke, sirova sirutka je pasterizirana na tri načina, odnosno tretirana je toplinom na 72°C/35 sekundi, zatim na 78°C/35 sekundi i na 85°C/40 sekundi, te je u uzorcima nakon centrifugiranja pri 3500 okretaja/10 minuta određena masa taloga koji je nastao zbog agregacije djelomično denaturiranih proteina sirutke, a čiju je denaturaciju uzrokovala toplinska obrada sirutke. Masa taloga pasteriziranih uzoraka sirutke kreće se u rasponu od 0,065 do 0,11 g, pri čemu je najnižu masu taloga imao uzorak pasteriziran na 85°C/40s (0,065 g), dok je sirova sirutka imala masu taloga od 0,09 g. Uzimajući u obzir i rezultate mikrobiološke analize pasteriziranih uzoraka sirutke, vidljivo je da pri 85°C/40s nema poraslih mikroorganizama (UB=0, K+P=0, EB=0), te rezultate senzorske analize (tablica 10), kao optimalan proces pasterizacije za daljnju proizvodnju napitaka na bazi sirutke odabran je režim 85°C/40s.

Tablica 9. Rezultati pH vrijednosti, °SH, mase taloga i broja enterobakterija, kvasaca i plijesni, te ukupnog broja mikroorganizama izraženih kao log CFU/mL sirove i pasterizirane sirutke različitim režimima.

REŽIM PASTERIZACIJE	pH [nakon pasterizacije]	Kiselost po Söxhlet-Henkelu (°SH)	Masa taloga [g]	Entero- bakterije [log CFU /ml]	Kvasci i plijesni [log CFU /ml]	Ukupan broj bakterija [log CFU /ml]
sirova sirutka	4,59	33,3	0,09	1,70	1,65	2,17
72°C/35s	4,48	30,2	0,07	0	0	1,88
78°C/35s	4,49	29,4	0,11	1	0	0,60
85°C/40s	4,54	30,7	0,065	0	0	0

Tablica 10. Srednje vrijednosti ocjena senzorske analize prve serije pokusa ispitivanja režima pasterizacije.

REŽIM PASTERIZACIJE	OKUS	MIRIS	BOJA	TALOG	IZGLED
Sirova sirutka	4,6	4,55	4,53	2,25	3,92
72°C/35s	4,63	3,83	4,97	4,43	4,93
78°C/35s	4,77	4,83	4,97	4,22	4,75
85°C/40s	4,73	4,75	4,95	3,63	4,63

U tablici 11 prikazane su vrijednosti L^* , a^* i b^* dobivene spektrofotometrom, pri čemu je vrijednost parametra a^* negativna za sva četiri uzorka što znači da su uzorci zelene boje, dok vrijednost parametra b^* ima pozitivan predznak što znači da uzorci poprimaju žutu boju. Uzorak sirutke pasterizirane na 85°C/40s ima najveću vrijednost parametra b^* i najmanju vrijednost parametra a^* jer intenzivno žuto-zelena boja koja je karakteristična za sirutku potječe od riboflavina (vitamin B₂) koji nastaje djelovanjem bakterija mliječne kiseline tijekom proizvodnje sira (Božanić i Tratnik, 2012). Parametar L , koji označava svjetlinu uzorka, ima visoke vrijednosti što znači da su uzorci vrlo svijetle boje, a uzorak pasterizirane sirutke pri 85°C/40s ima najmanju vrijednost parametra L jer ima najtamniju boju zbog provedbe pasterizacije na vrlo najvišoj testiranoj temperaturi.

Tablica 11. Srednje vrijednosti L^* , a^* i b^* za sirovu i pasteriziranu sirutku dobivene spektrofotometrom.

UZORAK	L^*	a^*	b^*	C^*	h
Sirova sirutka	82,82	-0,50	10,61	10,62	92,68
Sirutka past. 72°C/35s	89,07	-0,74	9,56	9,59	94,42
Sirutka past. 78°C/35s	88,86	-0,71	9,69	9,72	94,19
Sirutka past. 85°C/40s	79,26	-0,58	11,54	11,56	93,09

Sirutka pasteurizirana pri 85°C/40s koristi se za daljnju proizvodnju voćnih napitaka prema navedenim podacima u tablici 5. Proizvodi se devet različitih napitaka na bazi sirutke i voćnog koncentrata kojima sa nakon 24 sata čuvanja na hladnom određuje pH vrijednost koja je zadovoljavajuće vrijednosti ispod pet pH jedinica (4,04 - 4,08), a masa taloga iznosi od 0,17 do 0,36 g (tablica 12). Nastali talog u uzorcima sirutke nije prihvatljiv zbog čega takav proizvod ima loša senzorska svojstva i nije dobro prihvaćen na tržištu od strane potrošača. Od proizvedenih devet napitaka najbolje ocjene prilikom provođenja senzorske analize imali su napitci C i C2 (slika 5) koji su u daljnjem eksperimentu proizvedeni u većem volumenu, te je provedeno njihovo hladno skladištenje tijekom 21 dan pri čemu su uzorci analizirani 1., 5., 9., 14. i 21. dan.

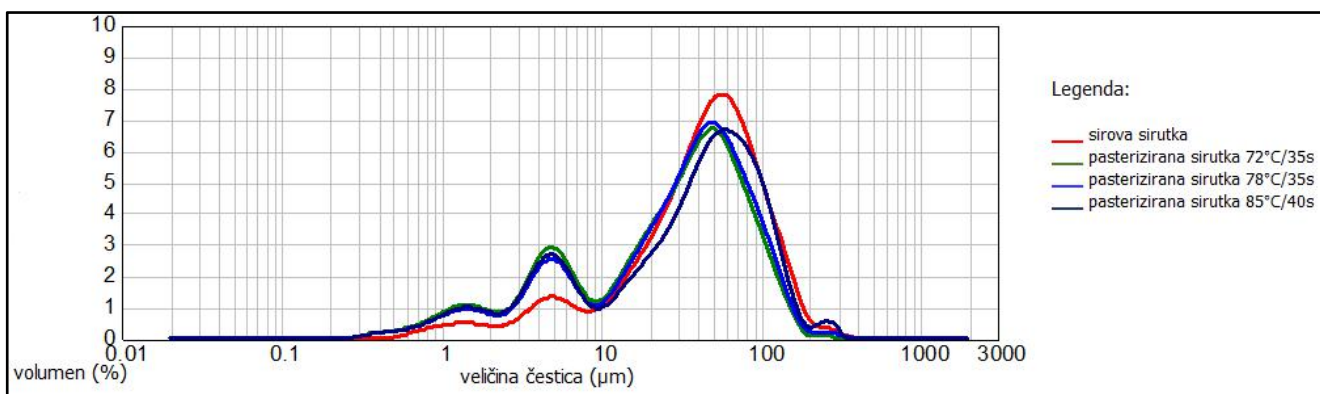
Tablica 12. Rezultati pH vrijednosti, mase taloga te smanjenja taloga prve serije eksperimenata.

UZORAK	pH [nakon 24h]	Masa taloga [g]	Smanjenje taloga [%]
A	4,05	0,20	67,500
A1	4,08	0,19	65,789
A2	4,04	0,17	61,765
B	4,07	0,23	71,739
B1	4,08	0,23	71,739
B2	4,07	0,25	74,000
C	4,06	0,27	75,926
C1	4,04	0,36	81,944
C2	4,05	0,23	71,739

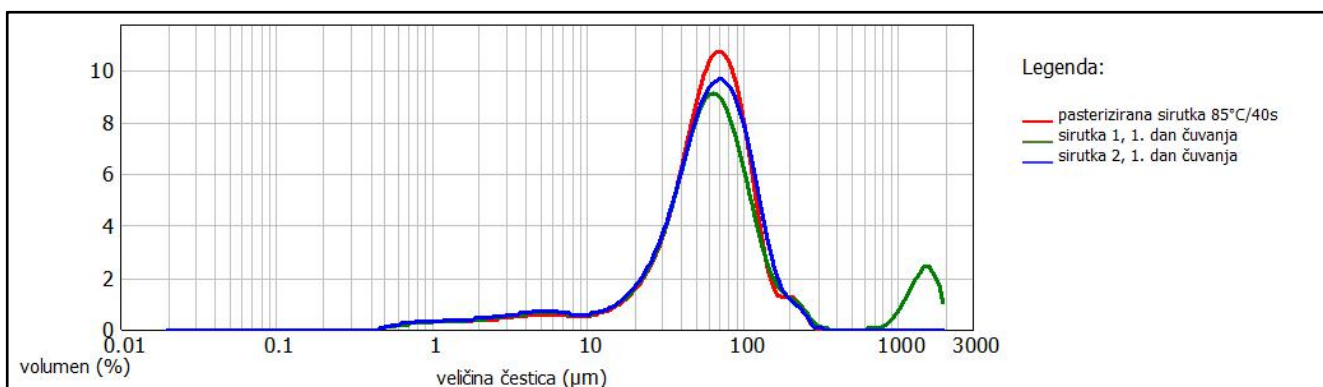


Slika 5. Rezultati senzorske analize prve serije eksperimenata.

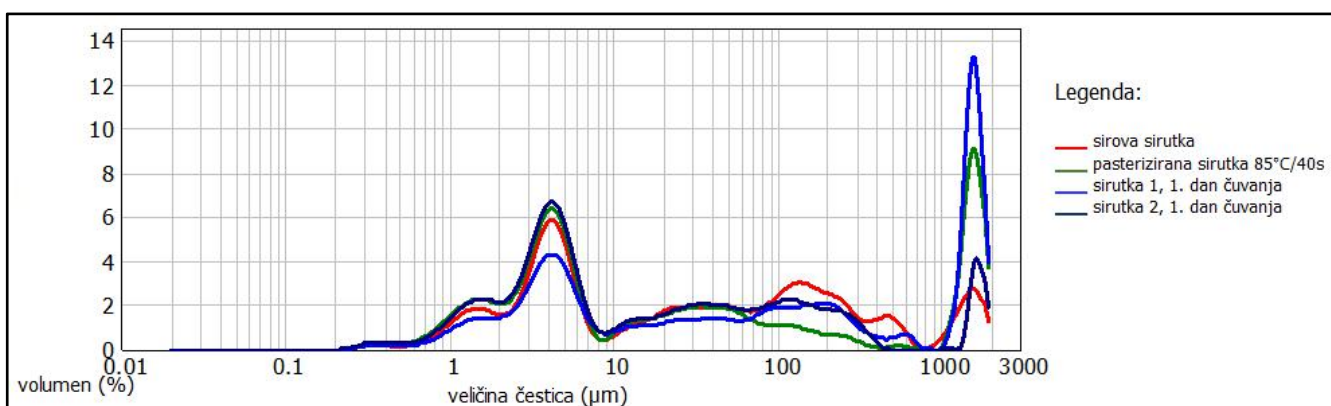
Dobiveni rezultati karakterističnih krivulja distribucije veličine čestica u prvoj seriji eksperimenata (slika 6) pokazuju da se pasterizacijom sirove sirutke različitim režimima proteini sirutke samo djelomično denaturiraju, dok α -laktalbumin zbog pH vrijednosti medija manjeg od 5 gubi kalcijeve ione i postaje skloniji denaturaciji zbog čega njegov pik na oko 1000 μm nije vidljiv. Krivulje sirutke 1 i sirutke 2 na slici 7 i slici 8 pokazuju kako sirutka sadrži više većih čestica (proteina), te samim time ima i širi raspon čestica.



Slika 6. Distribucija veličine čestica sirove i pasterizirane sirutke različitim režimima.



Slika 7. Distribucija veličine čestica napitaka na bazi sirutke i voćnog koncentrata iz prve serije pokusa.



Slika 8. Distribucija veličine čestica napitaka na bazi sirutke i voćnog koncentrata druge serije pokusa.

4.2. Analiza proizvedenih napitaka na bazi sirutke i voćnog koncentrata

Napitci na bazi sirutke i voćnog koncentrata pripremljeni su od sirutke pasterizirane na 85°C/40s prema podacima u tablici 5, te su tijekom ispitivanja njihove trajnosti čuvani na +4 °C u hladnjaku i analizirani 1., 5., 9., 14. i 21. dan. Sirutka 1 je napitak koji tijekom pohrane ima nižu pH vrijednost (4,08 - 4,15) u odnosu na sirutku 2 (4,19 - 4,24) jer sadrži veći udio voćnog koncentrata kruška marakuja koji povećava kiselost napitka. Tijekom hladnog skladištenja dolazi do povećanja suhe tvari oba voćna napitka, pri čemu se kod sirutke 2 količina suhe tvari na kraju čuvanja uzoraka povećala više nego količina suhe tvari kod sirutke 1. Veće povećanje suhe tvari kod sirutke 2, kod koje je dodana manja količina voćnog koncentrata pa je bilo za očekivati da će biti manje povećanje suhe tvari tijekom čuvanja uzoraka, rezultat je dodatka stevie kao zaslađivača koji sadrži saharozu te dovodi do značajnijeg povećanja suhe tvari sirutke 2. U tablici 13 prikazani su i postoci smanjenja taloga kod oba uzorka sirutke. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da se tijekom hladnog skladištenja uzoraka postotak smanjenja taloga smanjivao u oba slučaja, a pritom je došlo do značajnijeg smanjenja postotka taloga kod sirutke 2.

Tablica 13. Srednje vrijednosti analiziranih komponenti u proizvedenim napitcima na bazi sirutke i voćnog koncentrata.

Sirutka 1				Sirutka 2		
Vrijeme trajanja pohrane	pH	Smanjenje taloga [%]	Suha tvar [%]	pH	Smanjenje taloga [%]	Suha tvar [%]
1. dan	4,08	-	5,818	4,21	-	4,755
5. dan	4,11	74,000	-	4,21	79,032	-
9. dan	4,12	86,735	-	4,20	78,333	-
14. dan	4,15	63,889	6,895	4,24	56,667	4,723
21. dan	4,06	67,500	6,135	4,19	69,048	7,287

Izmjereni podatci L^* , a^* i b^* za aromatiziranu sirutku dobiveni spektrofotometrom (tablica 14) ukazuju na promjene koje se događaju s bojom tijekom skladištenja voćnih napitaka na hladnom tijekom 21 dan. Vrijednost parametra L kod sirutke 1 se tijekom čuvanja povećava jer uzorci postaju svjetliji, dok se kod sirutke 2 vrijednosti parametra L smanjuje jer uzorci poprimaju tamnije obojenje. Parametar a^* kod oba uzorka ima pozitivne vrijednosti i nalazi se u crvenom području, a u odnosu na nearomatiziranu sirutku dogodio se prelazak iz $-a^*$ u $+a^*$, odnosno iz zelene u crvenu boju što je rezultat dodatka voćnog koncentrata koji je promijenio boju sirutke 2, ali i dodatka stevie. Vrijednost parametra b^* kod oba uzorka sirutke ima pozitivan predznak što znači da aromatizirane sirutke imaju žutu boju, a tijekom skladištenja njegova vrijednost se smanjuje jer žuto obojenje postaje manje izraženo.

Tablica 14. Srednje vrijednosti L^* , a^* i b^* za pasteriziranu i aromatiziranu sirutku dobivene spektrofotometrom.

UZORAK	L^*	a^*	b^*	C^*	h
Sirutka past. 85°C/40s	79,26	-0,58	11,54	11,56	93,09
Sirutka 1 [1. dan čuvanja]	58,81	16,17	67,60	69,50	76,55
Sirutka 2 [1. dan čuvanja]	66,85	7,18	51,36	51,86	82,04
Sirutka 1 [5. dan čuvanja]	59,64	15,18	65,57	67,30	76,98
Sirutka 2 [5. dan čuvanja]	66,35	6,51	48,96	49,41	82,26
Sirutka 1 [9. dan čuvanja]	62,88	14,03	65,35	66,85	77,88
Sirutka 2 [9. dan čuvanja]	68,98	5,93	48,41	48,77	83,03
Sirutka 1 [14. dan čuvanja]	65,80	12,92	65,34	66,63	78,80
Sirutka 2 [14. dan čuvanja]	67,61	6,10	48,22	48,60	82,80
Sirutka 1 [21. dan čuvanja]	58,46	14,26	63,08	64,67	77,27
Sirutka 2 [21. dan čuvanja]	65,58	6,13	47,47	47,87	82,64

Mikrobiološke analize napitaka na bazi sirutke i voćnog koncentrata pokazuju mikrobiološku ispravnost napitaka sirutke 1 i sirutke 2 do 14. dana jer su vrijednosti za sve analizirane mikroorganizme uključujući njihov ukupan broj, broj kvasaca i plijesni, te broj enterobakterija bile ispod maksimalnih dopuštenih vrijednosti (Pravilnik, 2008). Tek su 21. dan zbog poraslih enterobakterija (roda *Escherichia*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Shigela* i drugih) napitci prestali biti mikrobiološki ispravni, dok su vrijednosti za ostale ispitivane mikroorganizme bile u skladu s dopuštenim vrijednostima (tablica 15).

Tablica 15. Srednje vrijednosti mikrobioloških analiza uzoraka sirutke tijekom pohrane.

	Mikro- organizmi	1. dan [log CFU /ml]	5. dan [log CFU /ml]	9. dan [log CFU /ml]	14. dan [log CFU /ml]	21. dan [log CFU /ml]	Maksimalno dopušteno [log CFU/ml]
Sirutka 1	Ukupan broj	0	1	1,08	1,48	2,35	m=10 ³ CFU/ml M=10 ⁴ CFU/ml
	Kvasci i plijesni	0	1,08	1,18	1,40	2,19	
	Enterobakterije	0	0	0	0	1	m<1 CFU/ml M=5 CFU/ml
Sirutka 2	Ukupan broj	0	0,60	1,23	1,34	2,22	m=10 ³ CFU/ml M=10 ⁴ CFU/m
	Kvasci i plijesni	0	0,60	1,30	1,40	2,42	
	Enterobakterije	0	0	0	0	1	m<1 CFU/ml M=5 CFU/ml

*m= minimalna granična vrijednost poraslih mikroorganizama

M= maksimalna granična vrijednost poraslih mikroorganizama

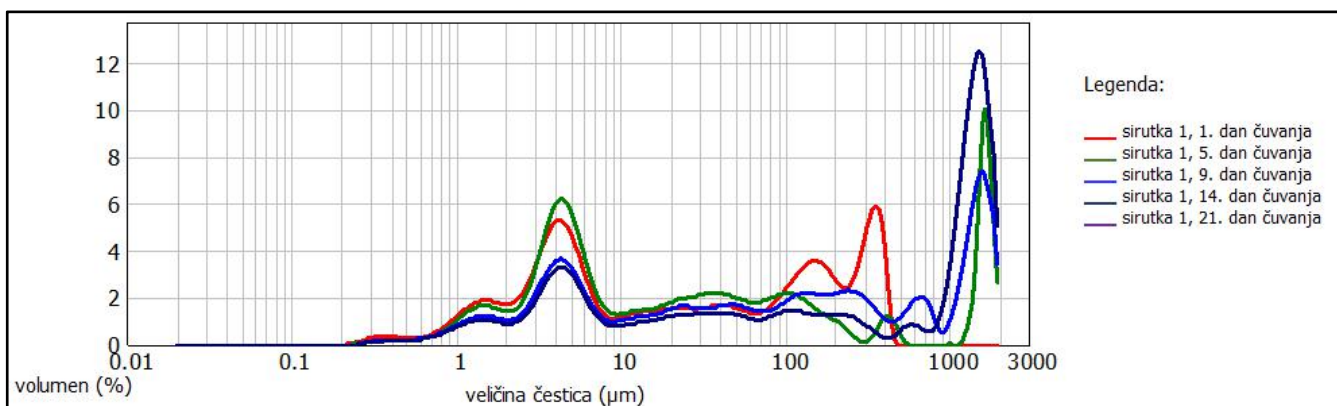
Senzorska analiza uzoraka sirutke 1 i sirutke 2 provedena je 1., 5., 9., 14. i 21. dan te su dobivene srednje vrijednosti ocjena koje su dali senzorski analitičari prikazane u tablici 16. Tijekom određivanja trajnosti proizvedenih napitaka, sirutka 2 je pokazala znatno bolje rezultate svih analiziranih komponenti tijekom 21 dana čuvanja napitaka, a sadržavala je manju koncentraciju dodanog voćnog koncentrata (1:10) i 2 %-tnu otopinu stevie.

Sirutka 1 kod koje je omjer voćnog koncentrata i sirutke bio 1:5, te nije sadržavala nikakav zaslađivač, imala je znatno izraženiji talog prilikom čuvanja napitaka upravo zbog veće koncentracije voćnog koncentrata kruška marakuja koji sadrži što je dovelo do većeg broja interakcija proteina sirutke i suhe tvari koncentrata, te je samim time dobila i znatno lošije ocjene.

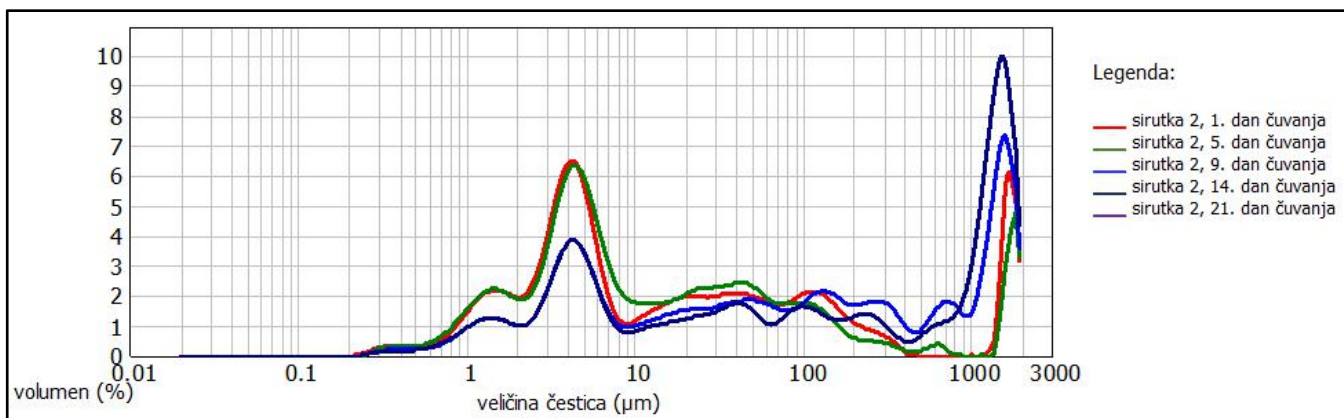
Tablica 16. Srednje vrijednosti ocjena senzorske analize tijekom hladnog skladištenja uzoraka sirutke.

Vrijeme trajanja pohrane	Sirutka 1					Sirutka 2				
	OKUS	MIRIS	BOJA	TALOG	IZGLED	OKUS	MIRIS	BOJA	TALOG	IZGLED
1. dan	4,41	4,47	4,00	4,55	4,08	4,78	4,89	4,80	4,67	4,87
5. dan	3,92	4,50	3,80	3,33	4,02	4,49	4,81	4,72	3,44	4,59
9. dan	4,31	4,44	3,78	3,20	3,78	4,13	4,36	4,88	4,05	4,60
14. dan	4,64	4,88	4,08	3,81	4,24	4,88	4,90	4,78	4,23	4,73
21. dan	4,78	4,47	4,26	4,00	4,06	4,64	4,68	4,90	3,80	4,40

Karakteristične krivulje distribucije veličine čestica sirutke 1 i sirutke 2 tijekom pohrane u trajanju od 21 dan pokazuju da sirutka sadrži više većih čestica (proteina), te da tijekom pohrane napitaka na bazi sirutke i voćnog koncentrata dolazi do denaturacije α -laktalbumina jer je vidljiv njegov pik na oko 1000 μm koji prvoga dana pohrane aromatizirane sirutke gotovo da i nije vidljiv. Denaturacija α -laktalbumina posljedica je kombinacije visoke temperature tijekom pasterizacije sirove sirutke, ali i niske pH vrijednosti samog napitka pri čemu ovaj protein sirutke gubi kalcijeve ione i postaje skloniji denaturaciji (Božanić i Tratnik, 2012). Isto tako, pri nižim pH vrijednostima α -laktalbumin poprima stanje tzv. „rastaljene globule“ pri čemu može vezati i do 270 molekula vode te postane izuzetno podložan denaturaciji (Lisak Jakopović i sur., 2016).



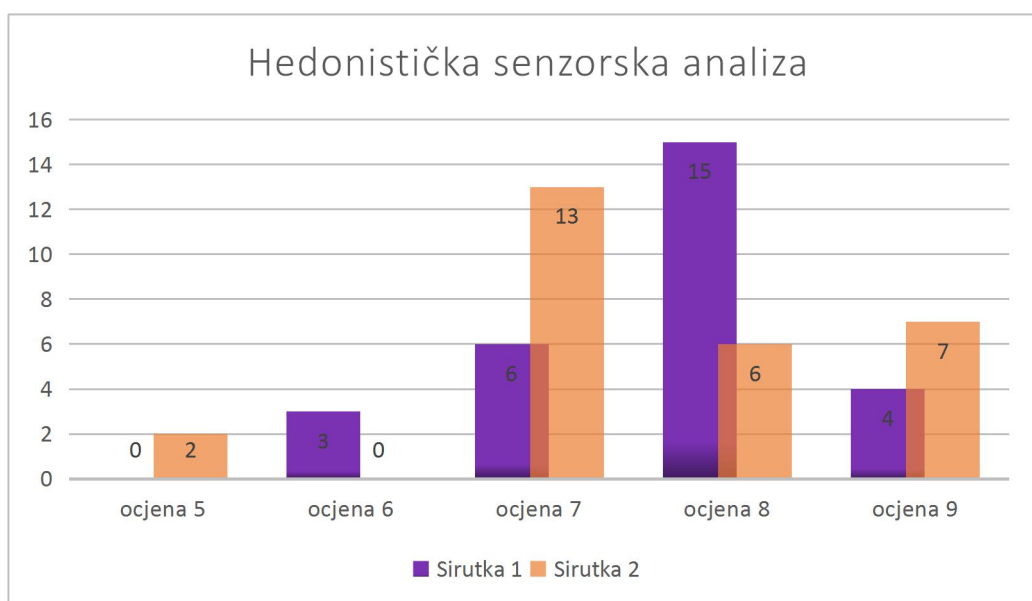
Slika 9. Distribucija veličine čestica sirutke 1 tijekom prve proizvodnje napitaka na bazi sirutke i voćnog koncentrata.



Slika 10. Distribucija veličine čestica sirutke 2 tijekom prve proizvodnje napitaka na bazi sirutke i voćnog koncentrata.

4.3. Ispitivanje prihvatljivosti proizvedenih napitaka

Ispitivanje prihvatljivosti proizvedenih napitaka sirutke 1 i sirutke 2 provedeno je na uzorku od 28 ispitanika pri čemu je više od 90 % ispitanika činila ženska populacija. Izračunavanjem srednje vrijednosti dobivenih ocjena za pojedini napitak vidljivo da je bolje ocijenjen napitak sirutka 1 (7,714), iako napitak sirutka 2 ima neznatno lošiju ocjenu (7,571). Rezultat koji je dobiven od strane potencijalnih potrošača ovih napitaka se razlikuje u odnosu na rezultate ocjena koje su tijekom 21 dana dali senzorski analitičari (tablica 16). S obzirom na vrlo slične konačne ocjene kod ispitivanja prihvatljivosti proizvedenih napitaka, ispitivanje bi trebalo napraviti na većem uzorku potencijalnih potrošača (N=200-500) kako bi nakon tako dobivenih rezultata mogli odrediti koju bi sirutku proizvodili u industrijskom mjerilu.



Slika 11. Hedonistička senzorska analiza (ispitivanje prihvatljivosti proizvedne sirutke).

5. ZAKLJUČAK

5. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata dobivenih u ovom radu može se zaključiti slijedeće:

- Proizvodnja napitaka na bazi sirutke i voćnog koncentrata provedena je pasterezacijom native sirutke na 85 °C/40 sekundi te su rezultati mikrobioloških analiza pokazali zdravstvenu ispravnost napitaka sirutka 1 i sirutka 2 u trajanju od 14 dana.
- Dodatkom voćnog koncentrata okusa kruška/marakuja povećana je suha tvar, a samim time i količinu taloga u proizvedenim napitcima, te je također dodatno smanjena pH vrijednost kisele sirutke.
- Senzorski analitičari bolje su ocijenili napitak sirutka 2 u kojem je omjer sirupa i sirutke iznosio 1:10 i nije sadržavao zaslađivač.
- Rezultati ispitivanja prihvatljivosti proizvedenih napitaka pokazali su da potencijalni potrošači preferiraju napitak sirutka 1 u kojem je omjer sirupa i sirutke 1:5, te kao zaslađivač sadrži 2 %-tnu otopinu stevie.
- Tijekom hladnog skladištenja proizvedenih napitaka boja napitka sirutka 1 postaje svjetlija, a napitka sirutka 2 tamnija, pri čemu kod oba napitka žuta boja postaje manje izražena tijekom skladištenja.
- Rezultati karakterističnih krivulja distribucije veličine čestica aromatiziranih napitaka pokazuju da tijekom hladnog skladištenja napitaka na bazi sirutke i voćnog koncentrata dolazi do denaturacije proteina sirutke α -laktalbumina čiji se pik na krivulji javlja na oko 1000 μm .

6. LITERATURA

6. LITERATURA

1. Anonimus 1 (2016) One RGB model, many RGB spaces <<http://colorblindtools.blogspot.com>> Pristupljeno: 17. lipnja 2018.
2. Baković D. (1972) Održivost sirutke. *Mljekarstvo* **22**: 249-253.
3. Baković D., Tratnik Lj. (1972) Mogućnosti korištenja sirutke u prehrani. *Mljekarstvo* **29**: 36-40.
4. Božanić R., Tratnik Lj. (2012) Mlijeko i mliječni proizvodi, Hrvatska mljekarska udruga. str. 27-57 i 357-362.
5. Božanić R., Jeličić I., Bilušić T. (2010) Analiza mlijeka i mliječnih proizvoda, Plejada. str. 27-86.
6. Božanić R., Jeličić I., Tratnik Lj. (2008) Napitci na bazi sirutke - nova generacija mliječnih proizvoda. *Mljekarstvo* **58**: 257-274.
7. Bulatović M.Lj., Rakin M.B., Mojović Lj.V., Nikolić S.B., Vukašinović Sekulić M.S., Đukić Vuković A.J. (2012) Surutka kao sirovina za proizvodnju funkcionalnih napitaka. *Hemijska industrija* **66**: 567-579.
8. Duvnjak Z. (1983) Sirutka i njeno korištenje u prehrambenoj i fermentacijskoj industriji. *Mljekarstvo* **33**: 45-60.
9. Grgurovac M. (2014) Patogeni mikroorganizmi u mlijeku i mliječnim proizvodima. Završni rad, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
10. Hegedušić P. (2004) Reološka svojstva proteina sirutke. Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
11. Herceg Z., Lelas V., Režek A. (2004) Funkcionalna svojstva α -laktalbumina i β -laktoglobulina. *Mljekarstvo* **54**: 195-208.
12. Herceg Z., Režek A. (2006) Prehrambena i funkcionalna svojstva koncentrata i izolata proteina sirutke. *Mljekarstvo* **56**: 379-396.
13. Herceg Z., Režek A., Rimac Brnčić S. (2008) Molekularna osnova funkcionalnosti proteina sirutke. *Mljekarstvo* **58**: 181-193.
14. Kirin S., Valinčić V. (1978) Izdvajanje sirutkinih proteina Centri-Whey postupkom. *Mljekarstvo* **28**: 170-174.

15. Lisak Jakopović K., Barukčić I., Božanić R. (2016) Physiological significance, structure and isolation of α -lactalbumin. *Mljekarstvo* **66**, 3-11.
16. Marinčić M. (2017) Utjecaj ultrazvuka na taloženje proteina u slatkoj sirutki nakon toplinske obrade. Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
17. Novoselec M. (2011) Utjecaj sladila stevie na profil slatkoće aromatiziranog jogurta od jagode. Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
18. Pravilnik o mikrobiološkim kriterijima za hranu (2008) *Narodne novine* **74** (NN 74/2008).
19. Režek Jambrak A. (2008) Utjecaj ultrazvuka na fizikalna i funkcionalna svojstva proteina sirutke. Disertacija, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
20. Samardžić A. (2012) Optimiranje voćnih napitaka na bazi slatke rekonstituirane sirutke. Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
21. Tratnik Lj. (2003) Uloga sirutke u proizvodnji funkcionalne mliječne hrane. *Mljekarstvo* **53**: 325-352.
22. Tretnjak K. (2017) Određivanje antioksidacijske aktivnosti u kiseloj i slatkoj sirutki. Završni rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Brezović Teusa